

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 592—598, November 1969

## Zuverlässigkeit der Bestimmung der 17-Ketosteroide mittels Gaschromatographie und Korrelation mit den Werten erhalten nach der Methode von ZIMMERMANN

Von H. GLEISPACH, BARBARA PODOLSKI<sup>1)</sup>, W. HOHENWALLNER und H. BERGER

*Aus der Universitäts-Kinderklinik Innsbruck (Vorstand: Prof. Dr. H. Berger)*

(Eingegangen am 27. Juni 1969)

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Vergleich der Werte, die für die 17-Ketosteroide einerseits bei Verwendung der Zimmermann-Reaktion zur Summenbestimmung und andererseits bei Verwendung der Gaschromatographie zur Bestimmung der Einzelmetabolite erhalten werden. Es wird die Genauigkeit der gaschromatographischen Steroidbestimmung im Routinebetrieb diskutiert. Die Einzelschritte der Bestimmung werden genau untersucht. Hierbei kann festgestellt werden, daß die Unterschiede in den erhaltenen Summen auf Substanzen zurückzuführen sind, die im wesentlichen erst bei der heißen Säurehydrolyse entstehen, mit Äther extrahierbar sind und mit Dinitrobenzol reagieren, aber keine Steroide darstellen. Auch konnten wir zeigen, daß die Genauigkeit der gaschromatographischen Bestimmung nach Erstellung von Eichkurven bei  $\pm 10\%$  liegt.

*The reliability of the determination of 17-ketosteroids by gas-chromatography and the correlation of the values with those obtained by the method of ZIMMERMANN*

In the present work, the values obtained for the determination of total 17-ketosteroids by the Zimmermann-Reaction were compared with those for the individual metabolites determined by gas-chromatography. The accuracy of the routine measurement of steroids by gas-chromatography is discussed; the separate steps of the determination were studied in detail. It was thus shown that the differences in the final totals were caused by substances that are produced by hot acid hydrolysis. These substances can be extracted with ether, they react with dinitrobenzene, but they are not steroids. It was also shown by the preparation of calibration curves, that the accuracy of the gas-chromatographic determination is  $\pm 10\%$ .

Als klinische Routinemethode zur Bestimmung der 17-Ketosteroide hat die Methode von ZIMMERMANN auch heute noch die größte Bedeutung, dennoch rücken die Methoden zur Bestimmung von Einzelmetaboliten immer mehr in das Blickfeld je mehr sie vereinfacht werden.

Von den chromatographischen Trennmethoden werden vor allem drei zur Bestimmung der Steroidhormone angewandt.

1. Papierchromatographie
2. Dünnschichtchromatographie
3. Gaschromatographie

Die Säulenchromatographie (1) wird nur bei einigen speziellen Trennproblemen verwendet, da sie recht genaue Ergebnisse liefert, für eine klinische Routineuntersuchung aber zu zeitraubend ist. Größere Bedeutung dürfte die von CREMER und Mitarbeitern (2) entwickelte Dünnschichtchromatographie erlangen, bei der in Kombination mit einem Zeiss-Densitometer Mengen von 10 pg noch nachgewiesen werden können. Die Entwicklung eines solchen Chromatogramms dauert weit weniger lang als die eines herkömmlichen Dünnschichtchromatogramms, so daß diese Methode vielleicht einen idealen Screening-Test darstellen oder in Kombination mit einer der anderen Trennmethoden eine rasche Bestimmung ermöglichen wird.

<sup>1)</sup> Die Untersuchungen wurden von BARBARA PODOLSKI im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

Von den oben angeführten Bestimmungsmethoden für die Harnsteroiden stellt die Gaschromatographie in Kombination mit einer raschen Vortrennung und Reinigung mittels Säulenchromatographie bzw. Dünnschichtchromatographie wohl die exakteste und auch rascheste Methode dar.

Vergleicht man die Werte, die bei der Bestimmung der 17-Ketosteroide mit der Methode nach ZIMMERMANN (3) erhalten wurden, mit der Summe der gaschromatographisch ermittelten Einzelmetabolite der 17-Ketosteroide, so findet man beträchtliche Unterschiede. Vor allem aber stehen die beiden Werte in keinem konstanten Verhältnis zueinander. Außerdem fällt auf, daß einerseits im Kindesalter die Differenzen größer sind als im Erwachsenenalter (Tab. 1a), andererseits bei Belastungstests nach LLOYD und Mitarbeitern (4) (30 IE ACTH/m<sup>2</sup> Körperfläche in einer Infusion während 6 Stunden, Harnsammeln ab Beginn der Infusion, dann durch 14 Tage täglich 0,033 mg Dexamethason/kg, nach dem 7. Tag Harnsammeln, dann während der Dexamethasongaben  $4 \times 1500$  IE Choriogonadotropine/m<sup>2</sup> Körperoberfläche jeden 2. Tag und wieder Harnsammeln) mittels der Gaschromatographie ein stärkeres Ansprechen auf die Belastung festzustellen ist als nach der Methode von ZIMMERMANN (Tab. 1b).

Wir befaßten uns mit der Frage, worauf diese Unterschiede in den nach beiden Methoden erhaltenen Werten zurückzuführen sind und wie genau die von uns durch-

**die bisherige  
Anwendung  
fanden wir zu  
aufwendig:**

**wir sind von unserer  
neuen Anwendung  
überzeugt:  
Asal-Blutzuckerpack  
enzymatisch**

**NEU**

**1. Vorbereitung zur Bestimmung**

- a. eine Vorratsflasche für das Puffer-Enzymgemisch muß gesäubert werden. in einen steril ausgedampften Kolben wird das Trockengemisch der angelieferten Reagenzien überführt. mit CO<sub>2</sub>-freiem Aqua bidest, in einer sauberen Mensur abgemessen, ist das trockene Puffer-Enzymgemisch zu lösen und in die Vorratsflasche zu überführen.
- b. das Chromogen oder Farbreagenz wird in der gelieferten Flasche mit der angegebenen Menge Aqua bidest gelöst.

entfällt

**2. Aufbewahrung**

Beide Lösungen sind im Kühlschrank aufbewahrt nur 4 Wochen haltbar

entfällt

**3. Ansatz des Tagesreagenzes**

- a. eine dunkle Flasche zum Ansatz des Tagesreagenzes ist zu säubern.
- b. die errechnete Menge Puffer-Enzymlösung muß in die Flasche gefüllt werden. (Raumtemperatur!)
- c. das Chromogen (Raumtemperatur!) wird mit der Pipette unter Schütteln hinzugefügt.
- d. eventuell nicht mehr in Lösung gehende Konzentrationsniederschläge sind abzufiltrieren.

**Inhalt einer Flasche  
mit der angegebenen Menge  
Aqua dest. lösen.**

**4. Haltbarkeit der Lösungen**

nach Anbruch der Reagenzien sind diese nur 4 Wochen haltbar.

**bis zum vollständigen Verbrauch  
ist das Pack 1 Jahr haltbar.**

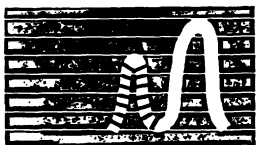
Chemische Fabrik Asal  
6231 Schwalbach/Taunus  
Lauenburger Straße 5  
Telefon (06196) 3031

Überzeugen Sie sich.  
Fordern Sie bitte Muster und  
Informationsmaterial an!



**PRÄZISIONS-CHEMIKALIEN**

# Standardmethoden für biochemische Trennungen



## Gelfiltration mit Sephadex und Sepharose

zur Trennung von Molekülen bis  $MW 40 \times 10^6$ . Die Gelfiltration

gestattet Trennungen labiler biologischer Substanzen unter sehr schonenden Bedingungen.



## Ionenaustauscher-Chromatographie mit Sephadex-Ionenaustauschern,

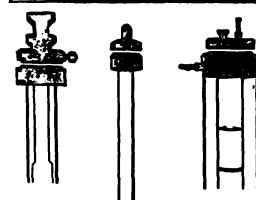
die die Vorzüge von Cellulose- und Kunstharzaustauschern ver-

einigen. Charakteristisch sind hohe Kapazität, niedrige unspezifische Adsorption und ausgezeichnete Reproduzierbarkeit.



## Verteilung in wäßrigen Phasen-Systemen mit Dextran und Dextran-Derivaten

zur Fraktionierung sehr hochmolekularer Stoffe wie Viren, Nukleinsäuren und Zellpartikeln unter sehr milden Bedingungen.



## Chromatographierohre

Unsere Chromatographierohre, die wir speziell für Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromato-

graphie entwickelt haben, ermöglichen reproduzierbare Trennergebnisse. Sie stehen Ihnen in großer Auswahl mit diversem Zubehör zur Verfügung.

## Literaturdienst

Als Hilfe für Wissenschaftler geben wir einen umfassenden Literaturdienst heraus. Eine jährlich erscheinende Referenzliste enthält etwa 1000 neue

Literaturstellen. Bitte schreiben Sie uns, wenn wir Sie in unseren Verteiler aufnehmen sollen. Fordern Sie auch Broschüren über unsere Separationsprodukte und das Literaturverzeichnis an.

SP/130

DEUTSCHE PHARMACIA GMBH



6 Frankfurt am Main · Inckusstr. 11

In der Schweiz: Instrumenten-Gesellschaft AG · 8040 Zürich · Turbinenstraße 31a · In Österreich: Unilabor GmbH · Wien IX/71 · Rummelhardtgasse 6/3

geführte gaschromatographische Bestimmungsmethode ist. Die Genauigkeit der Zimmermann-Reaktion soll in dieser Arbeit nur insoweit zur Diskussion gestellt werden, als sie die in unserem Laboratorium erhaltenen Werte betrifft, da ja über die verschiedenen Genauigkeitskriterien der Zimmermann-Methode schon ausführlich von berufener Stelle (3) berichtet wurde.

## Methodik

### Untersuchungsgang

#### I. Methode nach ZIMMERMANN

1. Streubreite bei Mehrfachbestimmungen durch Veränderung von Temperatur und Reaktionsdauer sowohl bei der Hydrolyse als auch bei der Farbreaktion.

2. Erstellung von Eichkurven für die einzelnen gaschromatographisch bestimmten Steroide auch nach der Methode von ZIMMERMANN (Abb. 1).

Tab. 1a

Vergleich der nach ZIMMERMANN bestimmten 17-Ketosteroide mit der Summe der gaschromatographisch erhaltenen Werte

Name	Alter	Geschlecht	Gesamt-17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN (mg/Tag)	gaschromatographisch (mg/Tag)	(in Prozenten nach ZIMMERMANN)
M. D.	12 Tage	♂	1,00	0,14	14
N. I.	7 Jahre	♂	1,73	0,26	15
L. E.	10 Jahre	♂	4,66	0,81	18
R. A.	10 Jahre	♂	3,97	1,78	45
W. E.	10 Jahre	♂	2,44	0,65	26
H. O.	10 Jahre	♂	1,11	0,34	31
T. A.	11 Jahre	♂	2,16	0,55	26
W. A.	11 Jahre	♂	3,89	0,79	20
S. T.	12 Jahre	♂	3,45	1,23	36
K. U.	13 Jahre	♂	3,25	2,43	75
S. M.	14 Jahre	♂	5,10	1,69	33
C. A.	15 Jahre	♂	7,38	4,23	57
P. E.	15 Jahre	♂	3,83	1,70	45
L. A.	25 Jahre	♂	6,70	5,48	82
R. A.	28 Jahre	♂	18,20	16,80	92
L. A.	29 Jahre	♂	20,60	5,75	28
G. H.	31 Jahre	♂	17,30	15,70	91

## II. Gaschromatographie

1. Eichkurven für sämtliche zu bestimmenden Steroide (in steigender Konzentration dem Harn zugegeben).

2. Streubreite bei Mehrfachbestimmungen.

3. Einfluß verschiedener Silylierungsverfahren.

a) Bistrimethylsilylacetamid (BSA) — Hexamethyldisilazan (HMDS) + Trimethylchlorsilan (TMCS).

b) Einfluß der HMDS- und TMCS-Konzentration (Tab. 3a).

c) Einfluß der Reaktionsdauer (Tab. 3b).

d) Einfluß der Reaktionstemperatur (Tab. 3c).

## III. Probenaufbereitung

1. Verschiedene Hydrolysenmethoden (Tab. 4 und 5).

a) Enzymatische Spaltung.

b)  $\beta$ -Glucuronidase-Spaltung und anschließende Solvolysse bei pH = 1 und kontinuierliche Ätherextraktion.

c) Hydrolyse durch HCl bzw.  $H_2SO_4$ .

2. Verfolgen jedes Einzelschritts der Hydrolyse, der Extraktion und Reinigung bei einigen Harnen nach beiden Methoden (Tab. 5).

## Arbeitsmethode

### I. Methode nach ZIMMERMANN

#### Hydrolyse

Bei einer Bestimmung der Gesamt-17-Ketosteroide verwendet man im allgemeinen die heiße Säurehydrolyse zur Spaltung der im Harn enthaltenen Steroidkonjugate. Bei der Zimmermann-Methode (3) versetzt man 25 ml des 24-Stdn.-Harnes mit 2,5 ml konz. HCl und kocht 20 Min. unter Rückfluß. Nach dem Abkühlen wird 3mal mit Äther extrahiert. Nach der Vorschrift von ZIMMERMANN und PONTIUS (5) werden 10 ml Harn mit 1 ml konz. HCl und 1 ml 10proz. Kupfersulfatlösung 20 Min. unter Rückfluß gekocht. BIRKET-SMITH (6) kochen 10 ml Harn mit 1 ml 40proz.  $H_2SO_4$  25 Min. unter Rückfluß. Alle drei Verfahren wurden bei uns durchgeführt (Tab. 5).

#### Extraktion und Reinigung

Anschließend an die Hydrolyse wird im Scheidetrichter 3mal mit je 50 ml Äther extrahiert. Die Extrakte werden mit 50 ml

Tab. 1b

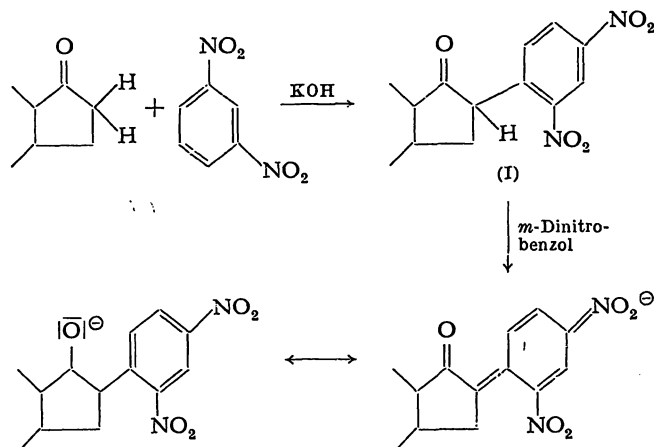
17-Ketosteroidausscheidung ( $\mu g$ /Tag) vor und nach Gabe verschiedener Hormonpräparate

Proband	Belastung	Pregnantriol	Pregnandiol	Testosteron	Androsteron	Ätiocholanolon	Dehydroepiandrosteron	11-Ketoandrosteron	11-Ketoätiocholanolon	11- $\beta$ -Hydroxyätiocholanolon	11- $\beta$ -Hydroxyandrosteron	Gesamt-17-Ketosteroide gaschromatographisch	nach ZIMMERMANN
♂ L. K.	vor ACTH 60 IE Dexamethason	520 1720	1840 2300	35 115	605 3780	3200 7750	480 3700	520 1700	394 815	364 394	550 320	5750 18460	20600 23300
27 Jahre	2,5 mg/Tag HCG 4 $\times$ 3000 IE u. Dexamethason 2,5 mg tägl.	340 1130	290 666	27 35	535 727	1040 1305	— 192	90 287	24 —	— —	— —	1690 2500	8900 10800
♀ N. R.	vor ACTH 20 IE Dexamethason 0,5 mg/Tag HCG 4 $\times$ 1000 IE	15 632 5 120	28 292 22 60	— 18 5 5	78 332 42 78	26 128 10 99	5 64 10 10	14 346 6 79	100 768 12 322	22 512 5 38	17 296 5 125	262 2440 85 751	1720 5770 1000 2600
♀ H. A.	vor ACTH 50 IE Dexamethason 2,0 mg/tägl. HCG 4 $\times$ 2500 IE u. Dexamethason 2,0 mg/tägl.	470 2200 595 2100	522 2630 550 10000	20 30 — 23	535 3190 195 690	1920 3960 336 2380	221 1370 — 129	257 1670 54 —	386 590 — —	106 480 — —	180 665 — —	3605 11920 584 3199	10800 14370 4370 6480

10proz. NaOH und 2mal mit je 50 ml Wasser gewaschen, vereinigt und der Gesamtextrakt wird zur Trockene eingedampft. Zuvor wird der Ätherextrakt mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert oder nach Abdampfen des Äthers nochmals mit etwas Methanol versetzt und das restliche Wasser mit dem Methanol entfernt. Nach unseren Erfahrungen sind die Verluste nach dem letzten Verfahren geringer.

#### Farbreaktion

Nach ZIMMERMANN handelt es sich um eine Addition des Carbenat-Ions des Ketons in Gegenwart von Alkali an Dinitrobenzol. Durch überschüssiges *m*-Dinitrobenzol wird die für Formel I angenommene Bindung zu einer Doppelbindung dehydriert und es entsteht ein resonanzfähiges Elektronensystem mit charakteristischer Absorptionsbande.



Der entstandene Farbkomplex wird dann mit Äther extrahiert und bei 510 nm gemessen. Vielfach wird auch empfohlen, bei zwei Wellenlängen zu messen und den Wert nach der Formel von GIBSON und EVELYN (8) zu korrigieren oder bei drei Wellenlängen zu messen und Störfaktoren nach der von ALLEN (9) bzw. der von BROWN (10) eingeführten Formel zu eliminieren. Wir arbeiten bei unseren Untersuchungen nach der Vorschrift von ZIMMERMANN (3). Der Rückstand des Harnextraktes wird in 5 ml Äthanol gelöst, dann werden folgende Lösungen hergestellt.

1. Harnextraktlösung: 1 ml Harnextrakt + 1 ml Äthanol + 2 ml 3proz. Dinitrobenzol + 2 ml 3N KOH.
2. Harnextraktblindlösung: 1 ml Harnextrakt + 3 ml Äthanol + 2 ml 3N KOH.
3. Reagenzienblindlösung: 2 ml Äthanol + 2 ml 3N KOH + 2 ml 3proz. Dinitrobenzol in Äthanol.

Nach dem Einpipettieren wird geschüttelt, dann 90 Min. im Dunkeln bei 25° stehengelassen. Nach Beendigung der Reaktion wird der Farbkomplex mit 5 ml Äther extrahiert und gegen Äther als Vergleichslösung bei 510 nm gemessen.

#### II. Gaschromatographie

Bei der gaschromatographischen Bestimmung stellt die Präparation die Hauptarbeit dar. Voraussetzung für eine einwandfreie gaschromatographische Bestimmung ist ein möglichst reiner Harnextrakt, wobei noch besonderes Augenmerk darauf zu richten ist, die Bildung von Artefakten bei der Präparation möglichst zu vermeiden.

#### Hydrolyse und Extraktion

Mit dem Einfluß, den die verschiedenen Hydrolyseverfahren auf die Analysengenauigkeit ausüben, setzten sich vor allem CURTIUS und Mitarbeiter (11) auseinander. Sie stellten fest, daß man die besten Ergebnisse erhält, wenn man zuerst die an Glucuronsäure gebundenen Steroide enzymatisch mit  $\beta$ -Glucuronidase spaltet, die freien Steroide mit Äther extrahiert und den Harn dann einer Solvolyse bei Raumtemperatur und kontinuierlicher Äther-

extraktion unterzieht. Zur Spaltung der Glucuronide wird ein aliquoter Teil des Harnes mit Essigsäure bzw. Natronlauge auf pH = 6 gebracht. Dann wird, auf je 100 ml Harn berechnet, 30 ml 1N Natriumacetatpuffer pH = 6 zugegeben und dann 10000 Fishman-Einheiten  $\beta$ -Glucuronidase und einige Tropfen Chloroform. Das Chloroform dient als Bakteriostaticum und zur Aktivierung der  $\beta$ -Glucuronidase. Nun wird der Harn während 24 Std. bei 38° inkubiert, abgekühlt und dann 3mal mit Äther extrahiert. Für die Extraktion haben wir uns ein von CURTIUS mitgeteiltes Verfahren zu eigen gemacht: 3 Schütteltrichter werden hintereinander aufgestellt und der Harn jeweils nach der Extraktion von einem in den anderen Schütteltrichter überführt. In gleicher Weise werden auch die Waschflüssigkeiten hindurchgeführt; auf diese Weise werden die bei der Extraktion und beim Waschen verursachten Verluste auf ein Minimum reduziert. Um den Ätherextrakt von sauren Substanzen zu befreien wird der Äther 2mal mit 2N Natriumcarbonat gewaschen, dann wird 3mal mit Wasser neutral gewaschen und der Äther zur Trockene eingedampft. Um dem Äther anhaftendes Wasser zu entfernen, wird etwas Methanol zugefügt und nochmals eingengt. Die bei der Ätherextraktion anfallende wäßrige Phase wird mit 6N Schwefelsäure auf pH = 1 angesäuert und in einem Extraktor für leichte Lösungsmittel während zweier Tage kontinuierlich mit Äther extrahiert. Anschließend wird der Ätherextrakt wieder 2mal mit 2N Natriumcarbonatlösung und 3mal mit Wasser gewaschen und mit dem Rückstand vom ersten Ätherextrakt vereinigt und abermals zur Trockene eingedampft.

#### Säulenchromatographie

Zur Reinigung und Vortrennung führen wir eine Säulenchromatographie an Aluminiumoxid (Woelm neutral, Aktivitätsstufe III) durch. In eine Säule mit 1,8 mm Innendurchmesser gibt man 5 ml absolutes Benzol und füllt 4 g Aluminiumoxid Luftblasen-frei ein. Das überstehende Benzol wird bis knapp über die Aluminiumoxidoberfläche abgelassen. Nun wird der Steroidextrakt mit 3mal 3 ml Benzol aufgebracht. Mit weiteren 11 ml Benzol wird nachgewaschen. Diese ersten 20 ml Benzol werden verworfen. Dann wird die erste Fraktion aufgefangen. Hierfür wird zuerst mit 40 ml Benzol und anschließend mit 30 ml Benzol + 0,2 ml Äthanol eluiert. In dieser Fraktion befinden sich die drei 11-Desoxy-17-Ketosteroide (Androsteron, Ätiocholanolon und Dehydroepiandrosteron). Die zweite Fraktion wird mit 30 ml Benzol + 0,5 ml Äthanol und dann 30 ml Benzol + 3 ml Äthanol sowie 5 ml Benzol + 5 ml Äthanol eluiert. Diese Fraktion enthält 11-Ketoandrosteron, 11-Ketoätiocholanolon, 11- $\beta$ -Hydroxy-androsteron, 11- $\beta$ -Hydroxy-ätiocholanolon sowie Pregnandiol, Pregnantriol und Pregnantrion. Nachdem jeweils zu beiden Fraktionen ein interner Standard zugefügt wurde, werden sie zur Trockene eingedampft mit Methanol: Äther = 1:1 (v/v) aufgenommen und in ein Spitzkölbchen überführt. Es wird abermals zur Trockene eingedampft.

#### Stabilisierung der Steroide

Zur gaschromatographischen Bestimmung müssen die Steroide in thermisch stabile, flüchtige Derivate überführt werden. Hierzu werden die Hydroxylgruppen entweder in die Silyläther oder in die Acetate überführt. Zur Bestimmung der Androgene und Pregnane verwenden wir die Silylderivate.

Zur Silylierung gibt es zwei Möglichkeiten:

- a) Verwendung eines Gemisches von Hexamethyldisilazan (HMDS) und Trimethylchlorsilan (TMCS) nach LUUKKAINEN und Mitarbeiter (12),
- b) Verwendung von Bistrimethylsilylacetamid (BSA) nach HORNING und Mitarbeiter (13).

Da wir uns bereits mit den Vorteilen der Verwendung von BSA an anderer Stelle auseinander gesetzt haben (14), soll hier nur auf den routinemäßig durchgeführten Silyliervorgang mit HMDS + TMCS eingegangen werden.

Folgende Schritte werden bei der Silylierung mit HMDS + TMCS unternommen:

Zum trockenen Steroidgemisch fügt man 0,5 ml/HMDS, 10proz. an TMCS. Das gut verschlossene Spitzkölbchen wird während einer Std. bei 65° inkubiert. Anschließend wird das Silyliergemisch mit trockenem Stickstoff abgeblasen, der Rückstand mit 0,2 ml Tetrachlorkohlenstoff aufgenommen und ein aliquoter Anteil dem Gaschromatographen injiziert.

#### Gaschromatographie

Die eigentliche Trennung und quantitative Bestimmung erfolgt gaschromatographisch. Als Chromatographen verwenden wir ein Fraktometer F 20 der Fa. Perkin Elmer. Gearbeitet wird mit 2 m Glassäule. Als Füllmaterial wird 3proz. XE 60 auf Gaschrom P verwendet. Die gaschromatographischen Bedingungen sind: Säulentemperatur 225°, FID und Verdampferblock auf 260°, Trägergas Stickstoff, etwa 50 ml/Min. Die quantitative Auswertung erfolgt mittels internem Standard, wir verwenden Androstendion.

### Ergebnisse

#### I. Methode nach ZIMMERMANN

##### 1. Untersuchung der Streubreite bei Mehrfachbestimmungen

Unser Augenmerk galt vor allem den Faktoren, die einerseits möglichst konstant gehalten werden sollten, deren Änderung aber innerhalb gewisser Grenzen aus apparativen Gründen nicht verhindert werden kann. Dies sind vor allem zwei Punkte:

- a) Einfluß der Reaktionstemperatur
- b) Einfluß der Reaktionsdauer.

Zur Untersuchung dieser Einflüsse stellten wir Paralleluntersuchungen mit Harnextrakten an und ließen wie bei der routinemäßigen Untersuchung jeweils zwei Kontrollproben mitlaufen. Wir fanden bei Temperaturschwankungen von  $\pm 1^\circ$  bei einer Inkubations-temperatur von 25° sowie bei Zeitschwankungen von  $\pm 10$  Min. bei einer Inkubationsdauer von 90 Min. Differenzen von nicht mehr als 10% im Endresultat. Die Veränderungen in der Extinktion waren zwar größer, durch den mitgeführten Standard aber werden diese Veränderungen weitgehend ausgeglichen.

##### 2. Eichkurven

Wir stellten für die gaschromatographisch ermittelten Einzelmetabolite Eichkurven auf (Abb. 1). Die verschiedenen Steroide zeigen eine verschieden starke Farbreaktion. Die Differenzen in der Farbtintensität variieren vom einfachen bis zu mehr als dem doppelten Wert. Bei einer Summenbestimmung kann diese Tatsache bei Überwiegen eines Metaboliten eine beträchtliche Veränderung des Wertes nach oben und unten bedingen.

#### II. Gaschromatographie:

##### 1. Eichkurven von dem Harn zugefügten Steroiden (Abb. 2)

##### 2. Streubreite bei Mehrfachbestimmungen

Die Ergebnisse beider Untersuchungen sind aus Abbildung 2 bzw. Tabelle 2 ersichtlich. Wir haben hier die eingesetzten Mengen Steroid gegen die bei Mehrfachbestimmungen gaschromatographisch gefundene Fläche eingesetzt, wobei die Fläche des internen Standards gleich 100 gesetzt wurde. Außerdem wurde für

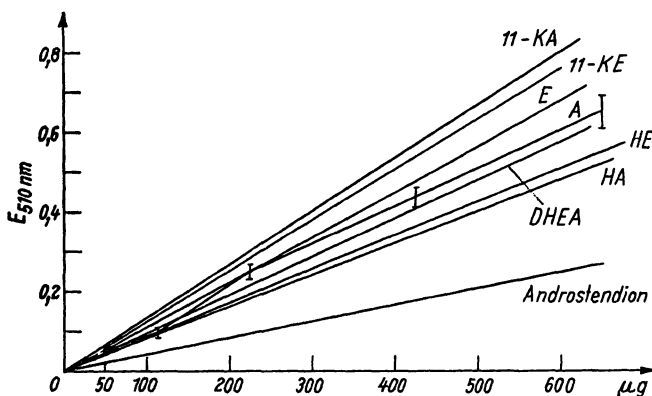


Abb. 1a

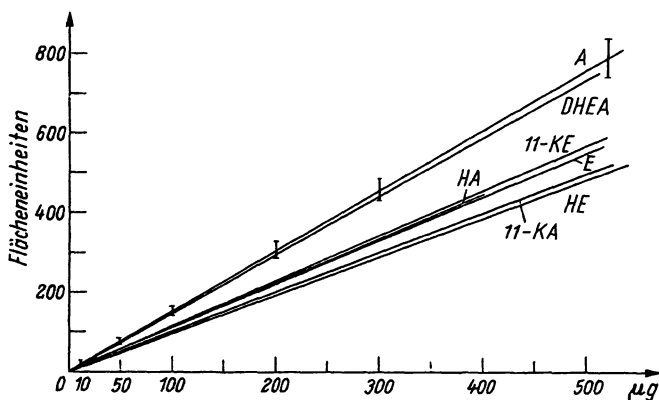


Abb. 1b

Abb. 1

Steroideichkurven für die Bestimmung nach ZIMMERMANN (a) und mittels Gaschromatographie (b)

Die Eichkurven wurden durch je 5 Parallelbestimmungen mit etwa 10, 50, 100, 200 und 500 µg pro Einzelsteroid erstellt. In den Abbildungen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur für Androsteron die Streubreite eingezeichnet. Bei den übrigen Steroiden wurden lediglich die erhaltenen Mittelwerte verbunden aber nicht gesondert eingezeichnet

A = Androsteron; E = Ätiocholanolon; DHEA = Dehydroepiandrosteron; 11-KA = 11-Ketoandrosteron; 11-KE = 11-Ketoätiocholanolon; HA = 11-β-Hydroxyandrosteron; HE = 11-β-Hydroxyätiocholanolon

Tab. 2

#### Gaschromatographie von Steroiden

Peak-Fläche, erhalten von 100 µg Steroid als Silyläther im Vergleich zur Fläche Standard = 100

a) Steroid direkt silyliert und injiziert, b) Steroid dem Harn zugesetzt extrahiert, säulenchromatographiert und silyliert

	a	b	Ausbeute b in % von a
Androsteron	155	155	100
Ätiocholanolon	121	110	91
Dehydroepiandrosteron	145	145	100
11-Keto-androsteron	122	105	86
11-Keto-ätiocholanolon	113	110	97
11-β-Hydroxy-androsteron	131	107	82
11-β-Hydroxy-ätiocholanolon	109	100	92
Pregnantriol	125	115	92
Pregnantriol	87	77	88
Pregnantriol	81	73	90

Androsteron Maximum und Minimum eingezeichnet. Die Eichkurve verläuft innerhalb des bei Routineanalysen interessierenden Bereichs geradlinig. Die Streuung beträgt nicht mehr als  $\pm 10\%$ . Die bei den einzelnen Steroiden gefundene unterschiedliche Streuung beruht auf verschiedenen Faktoren:

a) Verschieden große, wenn auch in allen Fällen geringe Verluste, bei Inkubation mit  $\beta$ -Glucuronidase und-Solvolyse des Harnes,

b) unterschiedliche Verluste an der Aluminiumoxidsäule bei der Vorreinigung,

c) unterschiedliche Verluste bei der gaschromatographischen Bestimmung.

Die absolute Größe der Verluste ist aber nicht so wichtig, weit bedeutungsvoller ist die Tatsache, daß alle diese Verluste genau reproduzierbar sind und somit eine auf  $\pm 10\%$  genaue Bestimmung bei Steroidmengen oberhalb von  $30 \mu\text{g}$  Steroid/24-Stdn.-Harn zulassen. Bei geringeren Mengen steigt die Streubreite an.

3. Einfluß der Silyliermethode bzw. geringer Abweichungen von der Vorschrift.

Der Einfluß einer Veränderung der Zusammensetzung und Konzentration des Silylierreagens innerhalb geringer Grenzen auf das Endergebnis ist in Tabelle 3a dargestellt. Veränderungen in der Silylierdauer ersieht man aus Tabelle 3b, den Einfluß der Temperatur aus

Tab. 3a

Einfluß der Silyliermittelkonzentration auf die erhaltenen Hormonwerte. Relative Peak-Flächen in Prozent des Standards Androstendion

	ml HMDS + % TMCS	Silyliermittelmenge pro Ansatz				
		0,5 10	1 10	0,3 10	0,5 20	0,5 5
Androsteron		150	157	154	143	148
Ätiocholanolon		121	122	124	116	120
Dehydroepiandrosteron		133	128	129	127	130
11-Keto-androsteron		122	117	120	118	127
11-Keto-ätiocholanolon		107	111	102	103	109
11- $\beta$ -Hydroxy-androsteron		131	135	133	124	133
11- $\beta$ -Hydroxy-ätiocholanolon		109	104	108	107	104
Testosteron		118	123	114	115	117
Pregnantriol		125	131	120	121	132
Pregnantriol		87	84	84	85	92
Pregnantriolon		81	84	83	78	81
Androstendion		100	100	100	100	100

Tab. 3b

Einfluß der Silylierdauer auf die erhaltenen Hormonwerte. Relative Peak-Flächen in Prozent des Standards Androstendion

Steroid	Silylierzeit in Minuten			
	60	40	80	100
Androsteron	150	155	148	149
Ätiocholanolon	121	118	120	117
Dehydroepiandrosteron	133	130	137	130
11-Keto-androsteron	122	117	125	
11-Keto-ätiocholanolon	107	110	109	
11- $\beta$ -Hydroxy-androsteron	131	124	127	
11- $\beta$ -Hydroxy-ätiocholanolon	109	113	107	
Testosteron	118	117	120	
Pregnantriol	125	125	122	
Pregnantriol	87	90	84	
Androstendion	100	100	100	100
Pregnantriolon	81	83	80	

Tab. 3c

Einfluß der Silyliertemperatur auf die erhaltenen Hormonwerte. Relative Peak-Flächen in Prozent des Standards Androstendion

Steroid	Temperatur		
	65°	55°	75°
Androsteron	150	148	156
Ätiocholanolon	121	115	123
Dehydroepiandrosteron	133	135	132
11-Keto-androsteron	122	118	120
11-Keto-ätiocholanolon	107	110	108
11- $\beta$ -Hydroxy-androsteron	131	146	128
11- $\beta$ -Hydroxy-ätiocholanolon	109	115	107
Testosteron	118	115	119
Pregnantriol	125	124	126
Pregnantriol	87	90	83
Pregnantriolon	81	85	79
Androstendion	100	100	100

Tabelle 3c. In allen Fällen ist der angegebene Wert der Mittelwert aus 3 Parallelbestimmungen, die bei der eingesetzten Menge von  $100 \mu\text{g}$  pro Steroid mit einer Genauigkeit von  $\pm 7\%$  übereinstimmen. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten unter verschiedener Reaktionsbedingung liegen innerhalb einer Streubreite von maximal  $\pm 15\%$ . Allerdings muß man beachten, daß nicht die absolute Flächengröße angegeben wird, sondern die Fläche Steroid bezogen auf Fläche Standard = 100, der von uns verwendete Standard Androstendion wird selbst nicht silyliert, dennoch ist er sicher auch mehr oder weniger empfindlich gegenüber Umweltseinflüssen.

### III. Vergleich der nach beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse.

Als erstes untersuchten wir bei einer Reihe nach ZIMMERMANN untersuchter Harns die Steroidausscheidung gaschromatographisch und verglichen die so erhaltenen Summen miteinander. Dabei stellten wir dreierlei fest:

1. Bei Erwachsenen stimmen die Werte besser überein als bei Kindern (Tab. 1a).

2. Bei Belastungstests (Tab. 1b) zeigen sich bei der gaschromatographischen Untersuchung weit größere Unterschiede in den Werten als bei Bestimmung der Gesamt-17-Ketosteroide nach der Methode von ZIMMERMANN.

3. In 3 Fällen konnten wir bei hohen 17-Ketosteroidwerten niedrige Werte für die Einzelmetaboliten feststellen (Tab. 6).

Um die unterschiedlichen Resultate zu erklären, untersuchten wir zuerst den Einfluß der Hydrolyse-Methode (Tab. 4). Die jeweils obere Spalte zeigt die Ergebnisse, die bei enzymatischer Spaltung erhalten wurden, gefolgt von Solvolyse und kontinuierlicher Ätherextraktion, die untere Spalte die Ergebnisse nach HCl-Hydrolyse.

Die gaschromatographisch erhaltenen Ergebnisse liegen bei der enzymatischen Methode eindeutig höher als bei der HCl-Spaltung, anders aber die Werte bei der Zimmermann-Reaktion.

Außerdem wurden nach der Säulenchromatographie aus einem Teil des Eluates die Steroide gaschromatographisch und aus einem zweiten Teil nach der Methode von ZIMMERMANN ermittelt. Die säulenchromatographische Vorreinigung ergab aber keine wesentliche Veränderung der Werte im Vergleich zu denen, die ohne Vorreinigung erstellt worden waren.

Daraufhin untersuchten wir bei zwei Harnen jeden Einzelschritt mit der Methode nach ZIMMERMANN und mittels Gaschromatographie (Tab. 5).

Aus dieser Tabelle ersehen wir, daß die Summe der gaschromatographisch ermittelten 17-Ketosteroide recht gut mit der kolorimetrisch ermittelten Summe übereinstimmt, wenn wir in beiden Fällen die Konjugate enzymatisch und daran anschließend durch Solvolyse spalten.

Da aber diese Werte wesentlich niedriger sind als die nach HCl-Hydrolyse und Zimmermann-Reaktion erhaltenen Werte oder die nach ZIMMERMANN-PONTIUS oder BIRKET-SMITH erhaltenen Resultate, wollten wir feststellen, wo die Verluste auftreten und ob es sich lediglich um einen Verlust der unspezifischen Chromogene oder auch um einen Verlust an Steroiden handelt. Ein Aliquot des Harnes wurde mit  $\beta$ -Glucuronidase inkubiert, dann der Hydrolyse mit HCl unterworfen und der Ätherextrakt der Zimmermann-Reaktion unterworfen. Es fand sich nahezu der gleiche Wert wie vorher.

Dann wurden aus einem Aliquot die Steroide nach Glucuronidasespaltung mit Äther extrahiert und aus dem verbliebenen Harn nach der Zimmermann-Methode die 17-Ketosteroide bestimmt, ebenso aus dem Ätherextrakt. Die Summe der beiden Werte entsprach wiederum dem ursprünglichen Wert. Nach der Solvolyse bei kontinuierlicher Ätherextraktion wurde wiederum der Ätherextrakt und der nun unserer Meinung nach von den Steroiden befreite Harn einer Zimmermann-Reaktion unterworfen. Hierbei fanden wir eine weitaus stärkere Reaktion in der verbliebenen wäßrigen Phase als erwartet. Die Summe der Werte

Tab. 4  
Vergleichende Untersuchung des Hydrolyseverfahrens auf die 17-Ketosteroid-Bestimmung mit dem Gaschromatographen und nach ZIMMERMANN. Hormonausscheidung in  $\mu\text{g}/\text{Tag}$

Name	Geschlecht	Hydrolyse mit	Androsteron	Ätiocholanolon	Dehydroepiandrosteron	11-Keto-androsteron	11-Keto-ätiocholanolon	11- $\beta$ -Hydroxy-androsteron	11- $\beta$ -Hydroxy-ätiocholanolon	gaschromatographisch, gesamt	17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN			anschließend HCl-Hydrolyse
											Fraktion 1	Fraktion 2	Gesamt	
K. A.	♂	$\beta$ -Glucuronidase HCl	2330 2200	936 880	109 11	260 46	340 67	140 21	98 14	4213 3239	3100 5070	620 1220	3802 6280	2535
Sch. H.	♀	$\beta$ -Glucuronidase HCl	730 670	1210 1040	480 260	370 58	280 34	111 17	76 12	3257 2091	2840 4325	1100 1235	4013 6773	4384
T. B.	♀	$\beta$ -Glucuronidase HCl	1550 1500	1700 1600	730 54	450 34	420 66	320 32	240 12	5410 3298	3840 3718	965 1014	5095 5540	1521

Tab. 5  
Untersuchung der Einzelschritte im Analysengang mit der Methode nach ZIMMERMANN und der Gaschromatographie an zwei Harnen. Angaben in  $\mu\text{g}/\text{Tag}$ . I = Proband K. W. ♂, II = Proband N. U. ♂

$\beta$ -Glucuronidase			Sulfatase	Bestimmung nach ZIMMERMANN	
I.					
Androsteron	372	485	Harn direkt nach ZIMMERMANN	6597	
Ätiocholanolon	596	225	Harn nach a) ZIMMERMANN-PONTIUS	6515	
Dehydroepiandrosteron	57	—	b) BIRKET-SMITH	6470	
11-Keto-androsteron	231	—	Harn nach $\beta$ -Glucuronidaseinkubation	6437	
11-Keto-ätiocholanolon	775	—	Harn nach Ätherextraktion	4114	
11- $\beta$ -Hydroxy-androsteron	165	—	Harn nach Solvolyse und kontinuierlicher Ätherextraktion	2436	
11- $\beta$ -Hydroxy-ätiocholanolon	237	—	Harn nach Ätherextraktion und Ätherextrakt	6406	
	2433	710	Harn nach Solvolyse und Summe der Ätherextrakte	5858	
ZIMMERMANN	2292	1130	Summe des Waschwassers	200	
Gaschromatographie	3143				
ZIMMERMANN	3422				
II.					
Androsteron	328	231	Harn direkt	8710	
Ätiocholanolon	1151	174	Harn nach a) ZIMMERMANN-PONTIUS	8600	
Dehydroepiandrosteron	42	246	b) BIRKET-SMITH	8540	
11-Keto-androsteron	244	—	Harn nach Inkubation	8490	
11-Keto-ätiocholanolon	495	—	Harn nach Ätherextraktion	4820	
11- $\beta$ -Hydroxy-androsteron	144	—	Harn nach Solvolyse und kontinuierlicher Ätherextraktion	3505	
11- $\beta$ -Hydroxy-ätiocholanolon	351	—	Summe des Waschwassers	200	
	2755	651	Harn nach Ätherextraktion und Ätherextrakt	8769	
ZIMMERMANN	3949	698	Harn nach Solvolyse und Summe der Ätherextrakte	8152	
Gaschromatographie	3406				
ZIMMERMANN	4647				

Tab. 6  
Niedrige Ausscheidung der Einzelmetabolite bei hohem Wert der 17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN in  $\mu\text{g}/\text{Tag}$

Name	Alter	Geschlecht	Androsteron	Ätiocholanolon	Dehydroepiandrosteron	11-Keto-androsteron	11-Keto-ätiocholanolon	11- $\beta$ -Hydroxy-androsteron	11- $\beta$ -Hydroxy-ätiocholanolon	Gesamt 17-Keto-Steroide		Prozent des Wertes nach ZIMMERMANN
										gaschromatographisch	ZIMMERMANN	
F. A.	37 Jahre	Q	160	43	16	12	23	38	16	308	13560	2,3
H. K.	I 28 Jahre	Q	183	93	5	27	21	7	21	357	14900	2,4
	II		147	73	5	78	13	9	19	344	15100	2,3



beider Ätherextrakte und der wäßrigen Phase nach erfolgter Extraktion ergab wiederum einen Wert, der vom ursprünglichen Wert nicht sehr verschieden ist.

Nun war noch zu klären, ob es sich bei der Farbreaktion der wäßrigen Phase um Steroide oder lediglich um unspezifische Chromogene handelt. Wir unterzogen den bereits extrahierten Harn wie vorher einer salzsauren Hydrolyse und daran anschließend einer Ätherextraktion. Der Ätherextrakt wurde zweigeteilt und mit einem Teil eine Farbreaktion mit Dinitrobenzol mit dem anderen Teil eine gaschromatographische Analyse durchgeführt. Die Farbreaktion bestätigte den ersten Befund, während im Gaschromatogramm keine Zacken auffindbar waren. Somit ist bewiesen, daß es sich bei diesen Chromogenen nicht um Steroide handelt. Dieser Befund stimmt auch recht gut mit dem Befund von CURTIUS (10) überein, daß Dehydroepiandrosteron-sulfat nach der angegebenen Solvolyse vollkommen gespalten wird und im Ätherextrakt vorliegt.

### Diskussion

Wir untersuchten, warum die Summe der gaschromatographisch ermittelten 17-Ketosteroide nicht mit dem nach der Methode von ZIMMERMANN erhaltenen Wert übereinstimmt und wie genau die gaschromatographische Methode ist.

Wir konnten zeigen, daß die nach beiden Methoden erhaltenen Summen bei enzymatischer Spaltung der Glucuronide und anschließender schonender Solvolyse und kontinuierlicher Ätherextraktion übereinstimmen. Außerdem konnten wir feststellen, daß bei der heißen Säurehydrolyse die gaschromatographisch nachweisbaren 17-Ketosteroide abnehmen, der Wert nach ZIMMERMANN höher ist als nach schonender Solvolyse bei Raumtemperatur.

Ein Harn wurde nun nach der schonenden Methode von Steroiden befreit und dann der heißen Säurehydrolyse unterworfen. In dem Ätherextrakt konnten gaschromatographisch keine Steroide nachgewiesen werden, wohl aber eine starke Zimmermann-Reaktion. Damit scheint nun bewiesen, daß bei der Säurehydrolyse Stoffe entstehen, die ätherextrahierbar sind und eine Zimmermann-Reaktion geben. Außerdem konnten wir mit unserer Untersuchung zeigen, daß bei der Ätherextraktion und beim Waschen des Ätherextraktes so gut wie keine Verluste auftreten, da wir keine Farbreaktion erhalten, wenn wir die Waschwässer einer Zimmermann-Reaktion unterwerfen. Die Verluste, die aber bei der Säulenchromatographie sowie bei der gaschromatographischen Bestimmung entstehen, sind stets reproduzierbar und somit durch eine Eichkurve eliminierbar.

Die Unterschiede der Summe der gaschromatographisch bestimmten 17-Ketosteroide und der nach der Zimmermann-Methode ermitteltem Wert konnten wie folgt geklärt werden:

1. Substanzen, die bei der heißen Säurehydrolyse entstehen, sind ätherextrahierbar und geben mit Dinitrobenzol eine Farbreaktion.
2. Die verschiedenen Steroide geben eine unterschiedliche Farbreaktion, dieser Faktor ist bei einer Summenbestimmung aber nicht eliminierbar. Für die gaschromatographische Bestimmung der 17-Ketosteroide konnte gezeigt werden, daß 1. die angegebenen Hydrolyseverfahren wirklich schonend sind und sämtliche Konjugate erfaßt werden, 2. sämtliche bei der Präparation auftretenden Fehler durch eine für jedes Steroid aufgestellte Eichkurve eliminierbar sind und somit die Genauigkeit einer gaschromatographischen Bestimmung für Mengen von mehr als 30 µg/24-Stdn.-Harn bei  $\pm 10\%$  liegt.

### Literatur

1. DINGEMANSE, E., L. G. HUIS in't VELD und S. L. HARTHOOG-KATZ, *J. Clin. Endocr.*, Springfield, **12**, 66 (1952). — 2. CREMER, E. und H. NAU, *Naturwissenschaften*, **55**, 651 (1968). — 3. ZIMMERMANN, W., *Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten*, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955). — 4. LLOYD, C. W., J. LOBOSKY, E. J. SEGRE, T. KOBAYASKI, M. L. TAYMOR und R. E. BATT, *J. Clin. Endocr.*, Springfield, **26**, 314 (1966). — 5. ZIMMERMANN, W. und D. PONTIUS, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **297**, 157 (1954). — 6. BIRKET-SMITH, E., *Acta endocr., Kh'vn*, **14**, 33 (1953). — 7. NEINHÖFFLER, O., K. THEWALT und W. ZIMMERMANN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **323**, 116 (1961). — 8. GIBSON, J. G. und K. A. EVELYN, *J. Clin. Invest.*, **17**, 153 (1938). — 9. ALLEN, W. M., *J. Clin. Endocr.*, Springfield, **10**, 91 (1950). — 10. BROWN, J. B., *Biochem. J.*, **60**, 185 (1955). — 11. CURTIUS, H. CH. und M. MÜLLER, *J. Chromatogr.*, **30**, 410 (1967). — 12. LUUKKAINEN, T., W. J. A. VAN DEN HEUVEL, E. O. A. HAAHTI und E. C. HORNING, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam, **52**, 599 (1961). — 13. HORNING, E. C., M. G. HORNING, N. IKEKAWA, E. M. CHAMBAZ, P. I. JAAKONMAKI und C. H. W. BROOKS, *J. Gaschromatogr.*, **5**, 283 (1967). — 14. GLEISPACH, H., *Z. analyt. Chem.*, **243**, 294 (1968).

Dr. H. Gleispach  
A-6020 Innsbruck  
Anichstr. 35